

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of Birchmeier et al.

Serial No. 09/641,104

Filed on August 17, 2000

For: Means for Therapy of Human Diseases, etc.

Attorney's Docket 0107-028

Hon. Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington DC 20231

Sir:

Perfecting priority claim

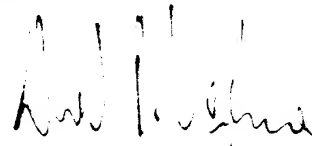
Enclosed herewith is a certified copy of German patent application No. 198 07 390.9 filed on February 21, 1998 in support of the priority claim therefor in the international parent application hereof.

Please amend the disclosure on Page 1, before line 1, by inserting  
--This is a continuation of international application No. PCT/DE99/00554, filed on February 21, 1999.--

GABRIEL P. KATONA L.L.P.  
708 Third Avenue, 14th floor  
New York 10017

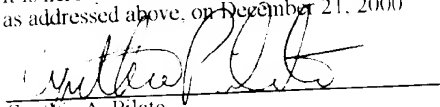
(212)370-4000

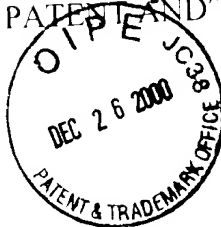
Respectfully submitted



Gabriel P. Katona  
attorney of record

It is hereby certified that this is being mailed,  
as addressed above, on December 21, 2000

  
Cynthia A. Pilato



RECEIVED

MAR 5 2001

TECH CENTER 1600 2900

1633  
1653  
p#6

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 198 07 390.9

**Anmeldetag:** 21. Februar 1998

**Anmelder/Inhaber:** Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,  
Berlin/DE

**Bezeichnung:** Von LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren abgelei-  
tete Peptide und ihre Verwendung

**IPC:** C 07 K, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 30. November 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag



2

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft von LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren abgeleitete Peptide und ihre Verwendung in der Tumorthherapie, insbesondere zur Behandlung von Kolonkarzinomen und Melanomen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

Wesentlicher Teil der Erfindung sind Peptide, die Teile der LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren umfassen, und ihre Varianten und Mutanten. Sie bestehen vorzugsweise aus 10-40 Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4. Speziell handelt es sich um folgende Peptide:

- N-terminale Aminosäuren 11-34 und 14-27 von LEF-1 folgender Sequenzen

- GDPELCATDEMIPFKDEGDPQKEK
- ELCATDEMIPFKDE

- N-terminale Aminosäuren 7-29 und 10-23 von TCF-4 folgender Sequenzen

- GGDDLGANDELISFKDEGEQEEK
- DLGANDELISFKDE

Die Verwendung der Peptide zur Tumorthherapie erfolgt bevorzugt nach Kopplung mit einem zweiten Peptid oder nach Drugdesign.

Anmelder: Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Erfinder: W. Birchmeier, J. P. von Kries

## Von LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren abgeleitete Peptide und ihre Verwendung

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft von LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren abgeleitete Peptide und ihre Verwendung in der Tumorthherapie, insbesondere zur Behandlung von Kolonkarzinomen und Melanomen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

$\beta$ -Catenin ist ein zytoplasmisches Protein mit verschiedenen Funktionen in der Zelle. Im Komplex mit den Zelladhäsionsmolekülen der Cadherin-Familie stellt  $\beta$ -Catenin die Verbindung zum Zytoskelett her (Hülsken, J. et al., E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J-Cell-Biol. 127: 2061-9, 1994).

Zusätzlich ist dieses Protein Bestandteil der wnt-Signaltransduktion in der Embryonalentwicklung. Der Transkriptionsfaktor LEF-1 wurde als Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin in dieser Signalkaskade indentifiziert (Behrens, J. et al., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature, 382: 638-42, 1996). Der Mechanismus der Signaltransduktion durch  $\beta$ -Catenin und LEF-1 ist geklärt. Er besteht in dem durch LEF-1 vermittelten Transport von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Im Zellkern reguliert dieser Komplex die Genexpression durch die im Komplex veränderte, LEF-1 induzierte DNA-Biegung und durch die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne von  $\beta$ -Catenin. Inzwischen wurde gezeigt, daß auch andere Mitglieder der LEF-1/TCF-Familie von Transkriptionsfaktoren diese Signaltransduktion vermitteln können (Korinek, V. et al., Constitutive transcriptional

activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science, 275: 1784-87, 1997).

Voraussetzung für diese  $\beta$ -Catenin-abhängige Signaltransduktion ist die Stabilisierung des zytoplasmatischen Pools von freiem, nicht Cadherin-gebundenem  $\beta$ -Catenin. Dieser Pool wird durch die Glykogen-Synthetase-Kinase  $\beta$  und durch das Tumorsuppressor-Genprodukt APC negativ reguliert.

Verschiedene Befunde sprechen dafür, daß dieser Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung spielt.

Für Karzinome und Melanome wurde gezeigt, daß Mutationen im N-Terminus von  $\beta$ -Catenin oder in der  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne von APC diese Regulation aufheben (Morin, P.J. et al., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science, 275: 1787-90, 1997).

Als Konsequenz wird der  $\beta$ -Catenin-Pool stabilisiert. In Melanomen führt diese Stabilisierung zur LEF-1 vermittelten Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, während in Kolonkarzinomen vor allem TCF-4 diese Funktion erfüllt. Die transkriptionelle Aktivität des Komplexes in Karzinom-Zelllinien wurde durch die Aktivierung eines Reportergens belegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß diese Aktivität in APC-defizienten Kolonkarzinom-Zelllinien, nach Wiedereinführung von APC inhibiert wurde.

APC-Mutationen wurden in der überwiegenden Mehrheit von Kolonkarzinomen identifiziert, während nicht APC-defiziente Tumoren Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen aufweisen. Das Resultat dieser Mutationen von APC oder  $\beta$ -Catenin ist die Aktivierung der Signaltransduktion durch den  $\beta$ -Catenin-LEF/TCF-Komplex. Es unterstreicht die Schlüsselrolle von  $\beta$ -Catenin in der Tumorentstehung. Da APC-Mutationen als ein frühes Ereignis in der Entstehung von Kolontumoren identifiziert wurden, ist die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-LEF/TCF-Komplexes wahrscheinlich ein zentraler Schritt in der Tumorentstehung.

Die Erfindung hat das Ziel, neue Mittel zur Behandlung von Karzinomen zur Verfügung zu stellen. Ihr liegt die spezielle Aufgabe zugrunde, Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren als Voraussetzung der Translokation und der Aktivität des Komplexes im Zellkern blockieren.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1, 8, 10 und 11 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Zur Realisierung wurden verschiedene Bindungsdomänen der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren für  $\beta$ -Catenin identifiziert. Diese dienen als Grundlage für die Synthese der erfindungsgemäßen Peptide. Diese Peptide werden gemäß der Erfindung für die Tumorthherapie eingesetzt, wofür 2 prinzipielle Wege möglich sind.

a) Verwendung der Peptide als solche

Ein direkter Einsatz der Peptide für die Behandlung von Tumoren kommt wegen ihrer Instabilität gegenüber Proteasen und wegen des Mangels an Membranpermeabilität im allgemeinen nicht in Betracht. Eine Stabilisierung erfolgt durch Kopplung mit einem 2. Peptid, wofür das sog. Antennapedia-Peptid RQIEIWFQNRMEWEE hervorragend geeignet ist. Dieses Peptid ist in der Lage, bis zu 100 Aminosäuren lange Fusionspeptide durch Zellmembranen in das Zytoplasma und den Zellkern zu transportieren. Die gekoppelten Peptide können vorteilhaft in der Tumorthherapie eingesetzt werden.

b) Verwendung der Peptide zum Drugdesign (Peptidmimikry).

Die erfindungsgemäßen Peptide dienen auch als Grundlage zum Design von Substanzen, die durch gezielte Modifikation die Stabilität und Wirksamkeit in der Zelle erhöhen ('Peptidomimetics'). Beispielsweise kann das durch Einführen reaktiver Gruppen, Austausch von Aminosäuren oder Einführung nichthydrolysierbarer peptidähnlicher Bindungen erfolgen.

Durch den Austausch des Kohlenstoffgerüsts der Peptide gegen synthetische Kohlenstoffgerüste mit gleicher Anordnung von funktionellen Gruppen kann die Stabilität der Moleküle ebenfalls erhöht werden ('Non Peptidomimetics'). Dieses molekulare Mimikry der biologischen Aktivität der von der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1/TCF für  $\beta$ -Catenin abgeleiteten inhibitorischen Peptide ermöglicht die Produktion potenterer Wirkstoffe für die Tumorthherapie.

Im einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

1. Charakterisierung des minimalen Bindungsdomäne von LEF/TCF für  $\beta$ -Catenin:

Zur Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne wurde das 'Hefe-2-Hybrid-System' eingesetzt. Die minimale Bindungsdomäne konnte auf die N-terminalen Aminosäuren 11-34 von LEF-1 begrenzt werden (in TCF4 auf die Aminosäuren 7-29). Die Interaktion von N-terminalen LEF-1 Fragmenten mit  $\beta$ -Catenin wurde anhand der Aktivierung eines lacZ-Reportergens bestimmt (s. Ausführungsbeispiel).

Im ELISA mit synthetischen Peptiden wurde gezeigt, daß das entsprechende Peptid (11-34) die  $\beta$ -Catenin/LEF-1-Komplexbildung spezifisch inhibiert. Analoges gilt für das Peptid 7-29 bezüglich der  $\beta$ -Catenin/TCF-4-Komplexbildung.

Ein weiteres inhibitorisches Peptid aus der homologen  $\beta$ -Catenin Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors TCF-4 (7-29) wurde im ELISA charakterisiert. Die für die Inhibition notwendige, minimale Sequenz des TCF-4 Peptides konnte auf Aminosäure 10 bis 23 (im Falle LEF1 auf 11-34) eingeengt werden. Die für die Inhibition essentiellen Aminosäuren wurden durch Mutagenese synthetischer Peptide identifiziert. Für die Funktion der Peptide ist eine symmetrische Anordnung von sauren Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) im Abstand von 4-5 Aminosäuren flankiert durch hydrophobe und basische Aminosäuren (Leucin und Isoleucin) wesentlich. Der Austausch von

Phenylalanin oder Lysin durch Alanin hebt die Inhibition durch das Peptid ebenfalls auf.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

1. Identifizierung der minimalen Bindungsdomäne von LEF-1 für  $\beta$ -Catenin:

Die Interaktion von Teildomänen von LEF-1 mit  $\beta$ -Catenin wurde im Hefe-2-Hybrid System durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität nach Angaben des Herstellers analysiert (Clontech). Für diesen Zweck wurde die für die N-terminalen Teildomänen von LEF-1 kodierende DNA in die Klonierungsstelle des Lex-A DNA-Bindungsdomäne enthaltenden Vektors BTM116 inseriert und durch Sequenzierung überprüft. Die DNA-Fragmente von LEF-1 wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Inkubation mit Restriktionsendonukleasen hergestellt.

Die  $\beta$ -Catenin kodierende DNA wurde in die Klonierungsstelle des Vektors pGAD424 (Clontech) für die Aktivierungsdomäne von GAL-4 kloniert (Behrens et al. 1996).

Für den Vergleich der Interaktion der Hybride wurden die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten unabhängiger Experimente gemittelt.

Die Spezifität der Interaktion der LEF-1-Hybride mit  $\beta$ -Catenin wurde anhand der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität von Hefen, die die LEF-Hybride und die GAL-4 Aktivierungsdomäne ohne  $\beta$ -Catenin herstellten, kontrolliert.

Die Expression der LEF-1 Hybride wurde im Immunoblot mit Hefezell-Lysaten durch Antikörper (Clontech) gegen die Lex-A-Domäne der Hybride kontrolliert. Für die Herstellung der Lysate wurden gleiche Hefemengen nach Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen eingesetzt.

2. Charakterisierung und Quantifizierung inhibitorischer Peptide im ELISA:



Für die Quantifizierung der Inhibition der LEF-1/ $\beta$ -Catenin Interaktion durch synthetische Peptide wurden beide Proteine in Bakterien rekombinant mit N-terminalen Histidin-Sequenzen hergestellt und durch Ni-Chromatographie gereinigt (Behrens et al. 1996). Die Peptide wurden von der Firma Biosyntan mit dem PSSM-8 Automaten (Shimadzu, Japan) unter Verwendung der Fmoc/But-Strategie hergestellt (E. Atherton und R.C. Sheppard. 1989 IRL Press, Oxford: "Solid phase peptide synthesis - a practical approach"). Ca. 50 ng LEF-1 wurde an den Näpfen von ELISA-Platten für 90 Minuten bei Raumtemperatur adsorbiert. Anschließend wurden die Näpfe mit 5% Magermilch-Pulver in PBS für 16 Stunden bei 41° C abgedeckt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in PBS mit 50 mM Tris HCl (pH 7.5). Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS wurden die Peptidverdünnungen zugegeben. Die Inkubation mit 50-100 ng  $\beta$ -Catenin wurden für 10 Minuten in Gegenwart von 200 mg/ml BSA durchgeführt. Die Komplexbildung von LEF-1 und  $\beta$ -Catenin wurde durch den Antikörper PA2 gegen den Carboxy-Terminus von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen (Hülsken et al. 1994). PA2 wurde für 10 Minuten in einer Titerverdünnung von 1:5000 in 3% Magermilchpulver in PBS zugegeben. Nach dem Waschen der Näpfe mit PBS erfolgte die Quantifizierung durch Peroxidase konjugierte Nachweisantikörper (1:2500 in 3% Magermilchpulver in PBS, Dianova) und den Umsatz von o-Phenylendiamin bestimmt durch photometrische Messung bei 405 nm. Die Peptide wurden in Konzentrationen von 300 mM bis 0.3 mM eingesetzt. Zur Kontrolle der Spezifität der Inhibition der Interaktion von LEF-1/ $\beta$ -Catenin wurde  $\beta$ -Catenin in den Näpfen adsorbiert und mit den gleichen Antikörpern in Gegenwart und Abwesenheit der Peptide nachgewiesen.

Für die Mutationsanalyse der Peptide wurden bei der Synthese die angegebenen Aminosäuren durch Alanin ersetzt. Die Quantifizierung der Inhibition der Komplexbildung von  $\beta$ -Catenin und LEF-1 erfolgte wie bereits beschrieben.

Patentansprüche

1. Peptide, die Teile der LEF-1-/TCF-4-Transkriptionsfaktoren umfassen, und ihre Varianten und Mutanten.
2. Peptid nach Anspruch 1, bestehend aus 10-40 Aminosäuren langen Sequenzen aus dem N-terminalen Bereich von LEF-1 bzw. TCF-4.
3. Peptid nach Anspruch 1-2, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 11-34 von LEF-1 folgender Sequenz  
GDPELCATDEMIPFKDEGDPQKEK
4. Peptid nach Anspruch 1-2, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 14-27 von LEF-1 folgender Sequenz  
ELCATDEMIPFKDE
5. Peptid nach Anspruch 1-2, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 7-29 von TCF-4 folgender Sequenz  
GGDDLGANDELISFKDEGEQEEK
6. Peptid nach Anspruch 1-2, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 10-23 von TCF-4 folgender Sequenz DLGANDELISFKDE
7. Peptide nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die sauren Aminosäuren im Abstand von 4-5 Aminosäuren angeordnet und durch hydrophobe und basische Aminosäuren flankiert sind.
8. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1-7 zur Tumorthherapie, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide mit einem zweiten Peptid gekoppelt und danach in geeigneter Form appliziert werden.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Peptid das Antennapediapeptid RQIEIWFQNRMEWEE eingesetzt wird.

21.02.99

8

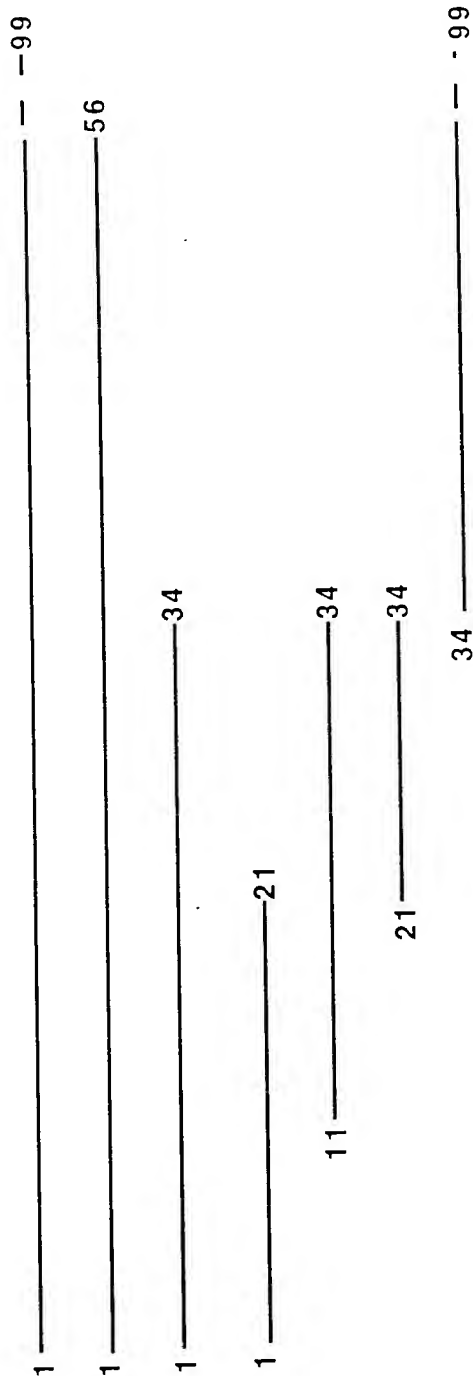
10. Verwendung nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Erhöhung der Stabilität modifiziert werden (Peptidomimetics)

11. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Kohlenstoffgerüst gegen Kohlenstoffgerüste mit gleicher Anordnung von funktionellen Gruppen ausgetauscht wird (Non Peptidomimetics).

# Identifizierung der $\beta$ -Catenin Bindungs-Domäne von LEF-1

**A**

1MPQLSGGGGGPELCA~~TD~~EMI~~PF~~KDEGDPQKEKIFA~~IS~~HP~~EE~~CDLADIK~~SS~~LV 56



$\beta$ -Gal Einheiten
190
184
342
1
295
0
7

**B**

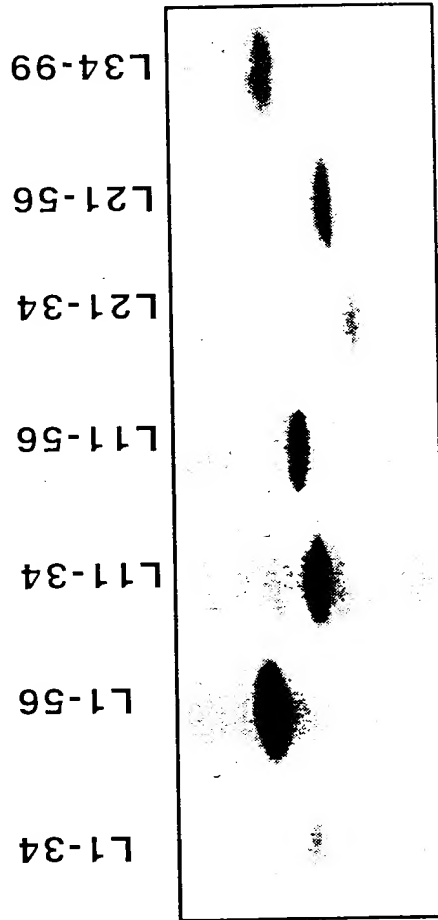


Abb. 1

21.02.99

12

# Inhibition der LEF-1/ $\beta$ -catenin Interaktion durch synthetische Peptide aus der Minimalen Bindungs-Domäne

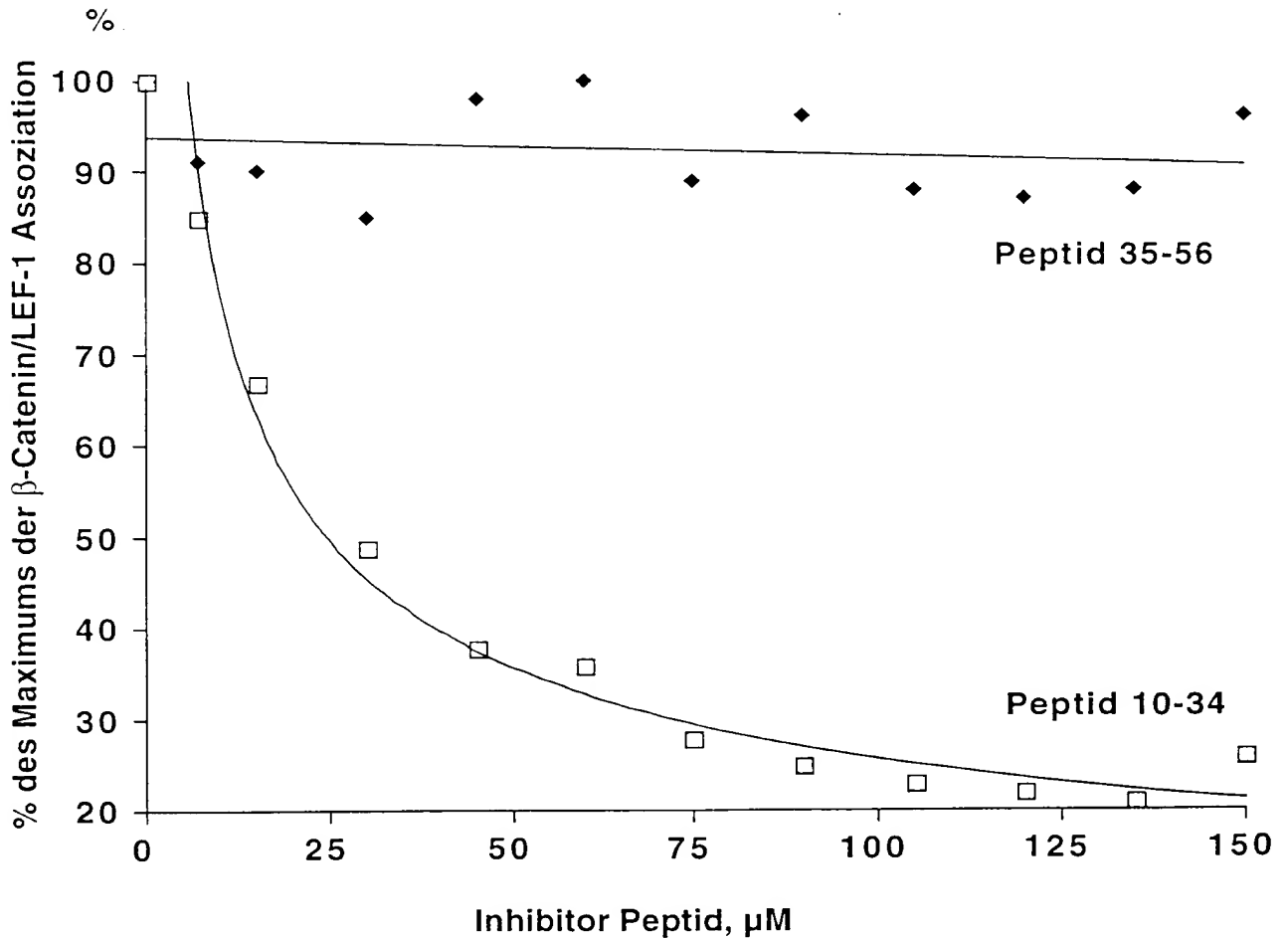
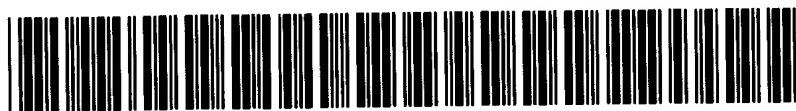


Abb. 3

US 0964110407P1



Creation date: 22-08-2003  
Indexing Officer: MKAHSAY - MULU KAHSAY  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 09641104

Legal Date: 02-08-2001

No.	Doccode	Number of pages
1	CTMS	3

Total number of pages: 3

Remarks:

Order of re-scan issued on .....